

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20142

研究課題名(和文) iTRAQ法を用いた網羅的膜蛋白質解析によるプラチナ耐性卵巣癌の新規治療法の樹立

研究課題名(英文) A new therapeutic target of platinum resistance ovarian cancer

研究代表者

松崎 慎哉 (Matsuzaki, Shinya)

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00467565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：プラチナ耐性卵巣癌は極めて予後不良であり新規治療法の開発がのぞまれる。申請者はプラチナ耐性卵巣癌において特異的に発現している候補蛋白質としてCD27とIMP-2を選別した。卵巣癌細胞株の3つではIMP-2の発現を認めなかったが、プラチナ耐性卵巣癌細胞株は3つ全てで発現を認めた。プラチナ耐性卵巣癌細胞株に対し、siRNAを用いIMP-2の発現を抑制したところ、シスプラチンの50%阻害濃度は167  $\mu$ Mから54  $\mu$ Mへと有意に低下した( $p < 0.01$ )。プラチナ耐性卵巣癌の臨床検体におけるIMP-2の発現を免疫組織学染色を用いて検討したところ20例中8例(40%)で強発現を確認しえた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of IMP-2 in platinum resistance ovarian cancer cells which had high level expression of IMP-2. In platinum resistance ovarian cancer lines, knockdown the expression of IMP-2 improved the sensitivity of cisplatin in vitro. Compared with control platinum resistance ovarian cancer cells (A2780/CisR cells), knockdown of IMP-2 induced roughly 3-fold greater chemosensitization to cisplatin (IC50: 167  $\mu$ M to 54  $\mu$ M;  $p < 0.01$ ). To elucidate the mechanism underlying platinum resistance induced by IMP-2, intracellular platinum accumulation of A2780/CisR control cells, A2780/CisR silencing IMP-2 cells after cisplatin exposure were analyzed. No significantly change of platinum had accumulated in A2780/CisR silencing IMP-2 cells compared with control cells ( $p = 0.24$ ). Thus, intracellular platinum accumulation was not changed in A2780/CisR silencing IMP-2 cells. To perform further investigation, we generate stable IMP-2 over expression in A2780 cell lines.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：婦人科腫瘍 プラチナ耐性卵巣癌 IMP-2

### 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は日本では毎年7000人以上が罹患し、4000人以上が死亡しており予後改善が求められている疾患である(国立癌センター 癌情報)。1980年以降、シスプラチンの登場により卵巣癌の治療成績は向上した。さらに、パクリタキセルが登場後さらに治療成績が向上し、シスプラチンを含むプラチナ製剤が卵巣癌の治療におけるキードラッグであることはよく知られた事実である。(Ozols RF et al. J Clin Oncol. 200;21:3194-200.) プラチナ製剤を含む化学療法は奏効率が高く、予後改善に寄与するが、5年以内に70%の症例が再燃する。また、化学療法を繰り返す内にプラチナ耐性が誘導されることが知られている(Harries M et al. Lancet Oncol. 2002;3:537-45.)。プラチナ耐性となった卵巣癌に有効な治療法は限られており、新規治療法の開発が望まれている(Davis A et al. Gynecol Oncol.2014;133:624-31)。

我々はこれまでにプラチナ耐性に関与する蛋白質(遺伝子)としてAnexin A4およびATP7Aを同定してきている。さらに、これらの機能解析や機能領域の同定を行ったがAnexin A4やATP7Aは阻害薬がないため、現時点では創薬には結びつけられていない(Morimoto A et al. Oncotarget. 2014;5:7776-87.) (Matsuzaki S et al. Int J Cancer. 2014;134:1796-809.)。そこで当研究では、プラチナ耐性卵巣癌に特異的に発現する蛋白質の解析を行い、同定した蛋白質の解析を行うことを目的とした。

### 2. 研究の目的

申請者も以前からプラチナ耐性卵巣癌の治療標的となりうる蛋白質(遺伝子)の同定を試み、数種類の蛋白質を同定しているが、いずれも創薬には結びつけられていない。そこで当研究では、プラチナ耐性卵巣癌に特異的に発現する蛋白質の網羅的な解析を行い、同定した蛋白質の解析が必要と考えた。これまで我々は、iTRAQ法を用いて子宮内膜癌に特異的に発現している膜蛋白質としてBST-2を同定し、ヌードマウスを用いた実験において抗体療法に成功した。(Yokoyama T et al, Int J Cancer. 2013; 132: 472-84) 今回、同様の手法であるiTRAQ法(LC-MS/MS)を用いて同定したプラチナ耐性卵巣癌の標的蛋白質を解析、治療応用することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 細胞株

卵巣漿液性腺癌細胞株(A2780, SKOV3, OVSAHO)、プラチナ耐性卵巣漿液性腺癌細胞株(A2780/CisR, SKOV3/CisR, OVSAHO/CisR)を用いた。細胞はD-MEMもしくはF-12培地に10%ウシ血清(FBS)(HyClone Laboratories, Logan, UT, USA)、1% penicillin-streptomycin (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)を添加したものを、5% CO2

の37℃インキュベーターで培養した。

#### siRNAを用いたIMP-2のノックダウン

QUIAGENより購入した2種類のIMP-2 siRNAを用い、IMP-2の発現をノックダウンした。Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA USA)を用いて遺伝子導入を行った。IMP-2をノックダウンした細胞株はそれぞれ、IMP-2 siRNA1とIMP-2 siRNA2とした。

#### IC<sub>50</sub>(50%阻害濃度)測定

A2780/CisR、A2780/CisR コントロール siRNA 株、A2780/CisR IMP-2 siRNA1、A2780/CisR IMP-2 siRNA2の4つの細胞について、D-MEM medium + 10% FBS+1% penicillin-streptomycinに懸濁し、2000 cells/wellの密度で96-well plates (Costar, Corning Inc, Corning, NY, USA)にまき、24時間培養し、0-500 μMのシスプラチンに暴露させ、72時間後に生存している細胞をWST-8 assayにより測定し細胞増殖が50%抑制される抗癌剤の濃度を決定した。

#### ウェスタンブロッティング

細胞はRIPA buffer(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1x phosphatase inhibitor cocktail (Nacalai Tesque) and 1x protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque))に溶解し、遠心分離(13,200 rpm, 4℃, 15 min)し、遠心上清を回収した。タンパク質の濃度はbovine serum albumin (BSA)を標準物質として、DC Protein Assay kit (Bio-Rad)を用いて定量した。

抽出したタンパク質は5-20% gradient SDS-PAGE ゲル(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)を用いて分離し、PVDF膜(Millipore, Bedford, MA, USA)に転写した。PVDF膜を1% BSA in TBS containing 0.1% Tween 20 (TBST)で1時間振とうすることでブロッキングし、rabbit polyclonal anti-IMP-2 antibody(11601-1-AP; Proteintech, Chicago, USA)にて1次抗体反応を室温で1時間行った。PVDF膜をTBSTで5分間、6回洗浄し、HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Amersham Biosciences UK, Buckinghamshire, UK)で2次抗体反応を室温で1時間行った。PVDF膜をTBS-Tで5分間、6回洗浄し、enhanced chemiluminescence (ECL) reaction system (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA)により、シグナルを検出した。ローディングコントロールとして、GAPDH antibody (Santa Cruz Biotechnology)に対する抗体を1次抗体として用いた。

#### 免疫組織学染色

申請者の過去の報告と同様の方法にて免疫組織学染色を行った。(Yokoyama T et al, Int J Cancer. 2013; 132: 472-84) プラチナ耐

性卵巢癌の臨床検体 20 例を用い、IMP-2 の発現の評価を行った。

1 次抗体として rabbit polyclonal anti-IMP-2 antibody(11601-1-AP; Proteintech, Chicago, USA)を用い、1 時間暴露した。

2 次抗体や染色方法としては VECTA STAIN ABC kit (PK-4001; Vector Laboratories)を用いた。染色の評価に関しては、光学顕微鏡を用いて観察を行った。染色の評価は下記に従って、染色強度および面積の score を掛けたものを、それぞれ 0~3 = 陰性、4~6 = 陽性、7~9 = 強陽性とした。

染色強度	なし	弱い	普通	強い
染色面積	0~9%	10~40%	41~70%	71~100%
score	0	1	2	3

### 細胞内プラチナ定量

A2780/CisR、A2780/CisR control siRNA、A2780/CisR IMP-2 siRNA1、A2780/CisR IMP-2 siRNA2 の 4 つの細胞をそれぞれ 5 x 10<sup>6</sup> の 6 乗個の細胞を 15 cm dish に 2 枚ずつ散布した。翌日に、100 μM のシスプラチンに 1 時間暴露した後に、dish を PBS にて 3 回洗浄し通常の medium に交換した。3 時間後に細胞を回収し、Agilent 7500ce の ICP-MS (Agilent, Santa Clara, CA)を用いて、細胞内プラチナ定量を行った。

### IMP-2 を恒常的に発現させた細胞株の樹立

A2780 細胞株に対して IMP-2 を恒常的に発現させた細胞株を樹立するため、A2780 細胞株に Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA USA)を用いて IMP-2 を組み込んだ pRS ベクターをトランスフェクションし、30 ng/ml の Puromycin (Invitrogen)を用いることでセレクションした。3 つの A2780 IMP-2 強制発現株を作成しそれぞれ A2780 IMP-2 s1-s3 細胞を作成した。また、コントロールとして、空ベクターをトランスフェクションしたコントロールベクター (A2780 Control 細胞) を樹立した。

### 統計解析

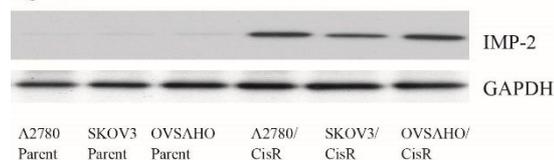
統計解析は One-way ANOVA test と Dunnett テストにより群間の有意差検定を行った。p<0.05 を統計的に有意と判定した。

### 4. 研究成果

#### 「プラチナ耐性卵巢癌細胞株における IMP-2 の発現」

プラチナ耐性卵巢癌細胞株において高発現する蛋白質として IMP-2 を同定した。これらを他の細胞株と比較し検討したところプラチナ耐性卵巢漿液性腺癌細胞株では卵巢漿液性腺癌細胞株の親株と比較し CD27 と IMP-2 の強発現を認めた。このことから、プラチナ耐性卵巢癌細胞株では CD27 と IMP-2 の発現が誘導されていることがわかった。プラチナ耐性因子の研究として IMP-2 の検討を行っていくこととした。(Figure1A)

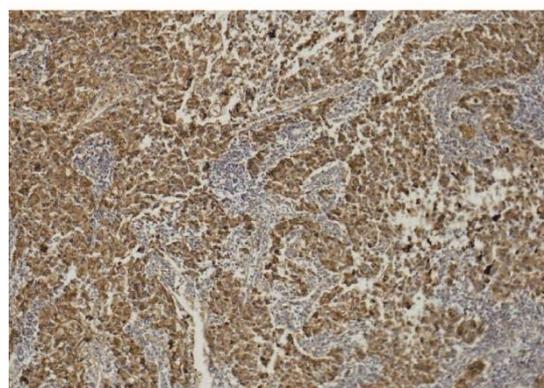
Figure 1A



#### 「プラチナ耐性卵巢癌細胞株臨床検体における IMP-2 の発現」

プラチナ耐性卵巢癌細胞株において IMP-2 の発現を認めたが、臨床検体において同様に発現を認めるかは未だ示されていない。そのため、臨床検体においても同様に発現を認めるか、免疫組織学染色にて解析を行ったところ臨床検体 20 例中 IMP-2 は 8 例(40%)で下記に示す様な、強い発現を認めた。(Figure1B、x 40)

Figure 1B



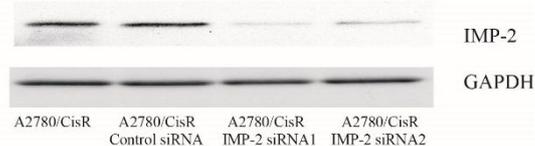
Strong

#### 「A2780 シスプラチン耐性卵巢癌細胞株に対して IMP-2 の発現を抑制したところシスプラチンの感受性を改善した」

A2780/CisR 細胞株において、IMP-2 をノックダウンした後に、シスプラチンの感受性を解析した。

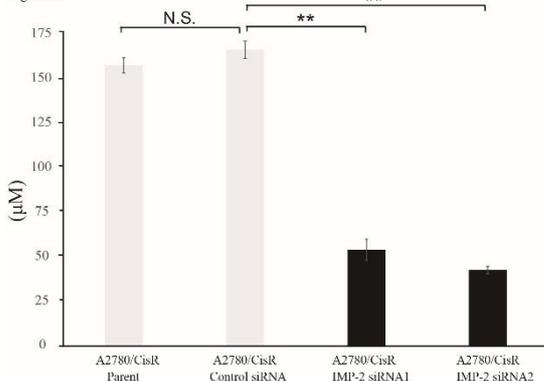
IMP-2 のノックダウンが行えていることを、Western Blotting 法にて確認した。(Figure2A)

Figure 2A



A2780/CisR細胞株におけるIMP-2のノックダウンはcontrol siRNA株におけるシスプラチンのIC<sub>50</sub>(166.6μM)と比較して、A2780/CisR IMP-2 siRNA1細胞とA2780/CisR IMP-2 siRNA2細胞で有意な低下を認められた(A2780/CisR IMP-2 siRNA1; 54.1μM, p<0.01, A2780/CisR IMP-2 siRNA2; 42.9μM, p<0.01)(Figure2B)

Figure 2B



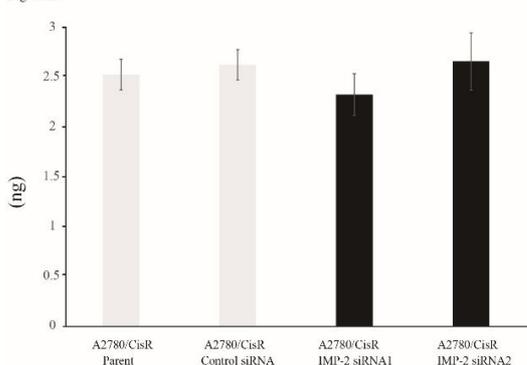
「IMP-2の発現抑制はシスプラチン暴露後の細胞内プラチナ蓄積量を変化させなかった」

A2780/CisR, A2780/CisR control siRNA, A2780/CisR IMP-2 siRNA1, A2780/CisR IMP-2 siRNA2の4つの細胞株をについて、シスプラチン暴露後のプラチナ蓄積量を評価した。

A2780/CisR control siRNA細胞におけるプラチナの細胞内蓄積量(2.6ng)と比較して、A2780/cisR IMP-2 siRNA1とA2780/CisR siRNA IMP-2 siRNA2細胞で有意な変化を認めなかった(A2780/CisR IMP-2 siRNA1; 2.3ng, p=0.24, A2780/CisR IMP-2 siRNA2; 2.7ng, p=0.33)。

これらの結果よりIMP-2がプラチナ耐性卵巣癌細胞株においてプラチナの取り込み、もしくは排出には関連していないことが示された。(Figure 2C)

Figure 2C

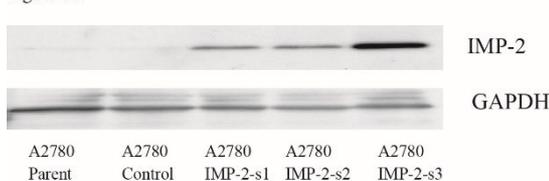


「IMP-2の発現を恒常的に発現させた卵巣癌細胞株の樹立」

卵巣癌細胞株A2780においてより詳細な機能解析を行うためにIMP-2の発現を恒常的に発現させた細胞株を作成し、プラチナ耐性が誘導されるかを検討し、またIMP-2が誘導するプラチナ耐性の機序解明を行うこととした。

A2780細胞の親株に対してIMP-2を遺伝子導入し、puromycinで選択を行い、A2780 IMP-2-s1~s3細胞株を樹立した。IMP-2の発現をWestern Blotting法にて確認した。(Figure3A)

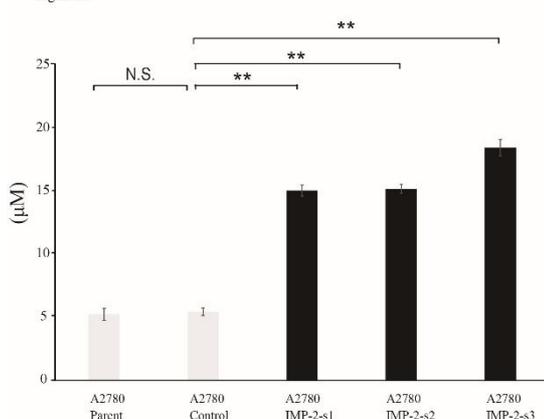
Figure 3A



「IMP-2が恒常的に強制発現された細胞株ではシスプラチン耐性が誘導されていた」

A2780 IMP-2-s1~s3細胞株1~3はコントロールベクター株におけるシスプラチンのIC<sub>50</sub>(5.5μM)と比較して3クローンにおいて18μM前後と有意な上昇を認め(p<0.01)、シスプラチンのIC<sub>50</sub>が約3倍に上昇し、耐性が誘導されることが示された。(Figure3B)

Figure 3B



まとめ

プラチナ耐性卵巣癌においてIMP-2が強発現していることを初めて示した。また、卵巣癌細胞株にIMP-2を遺伝子導入するとプラチナ耐性が誘導されることを同時に示した。今後、IMP-2がプラチナ耐性を誘導する機序解明とin vivoでの解析を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Hiramatsu, K. Yoshino, K. Serada, S. Yoshihara, K. Hori, Y. Fujimoto, M. Matsuzaki, S. Egawa-Takata, T. Kobayashi, E. Ueda, Y. Morii, E. Enomoto, T. Naka, T. Kimura, T., Similar protein expression profiles of ovarian and endometrial high-grade serous carcinomas, Br J Cancer, 査読有, 114(5):554-61, 2016 DOI:10.1038/bjc.2016.27
2. Matsuzaki, S. Yoshino, K. Ueda, Y. Matsuzaki, S. Kakuda, M. Okazawa, A. Egawa-Takata, T. Kobayashi, E. Kimura, T., Potential targets for ovarian clear cell carcinoma: a review of updates and future perspectives, Cancer Cell Int, 査読有, 15:117, 2015 DOI:10.1186/s12935-015-0267-0
3. Hiramatsu, K. Serada, S. Kobiyama, K. Nakagawa, S. Morimoto, A. Matsuzaki, S. Ueda, Y. Fujimoto, M. Yoshino, K. Ishii, K.J. Enomoto, T. Kimura, T. Naka, T., CpG oligodeoxynucleotides potentiate the antitumor activity of anti-BST2 antibody, Cancer Sci, 査読有, 106(10):1474-8, 2015
4. 松崎慎哉, <若手の最新研究コーナー> iTRAQ法による網羅的膜蛋白質解析を用いた子宮平滑筋肉腫の新しい治療法の樹立, 産科と婦人科, 査読有, 82(2):82-86, 2015 DOI:10.1111/cas.12738

〔学会発表〕(計7件)

1. Kakuda, M. Matsuzaki, S. Tanaka, Y. Takata, T. Kobayashi, E. Ueda, Y. Yoshino, K. Kimura, T., ATP7A is a promising therapeutic target for uterine leiomyosarcoma, 第75回日本癌学会学術集会, 10.6-8/'16, 横浜
2. 角田守 松崎慎哉 田中佑典 森本晶子 高田友美 小林栄仁 上田豊 吉野潔 木村正, ATP7A は子宮平滑筋肉腫の治療標的である, 第15回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会, 8.19-20/'16, 札幌
3. 角田守 松崎慎哉 田中佑典 高田友美 小林栄仁 上田豊 吉野潔 木村正, ATP7B は子宮平滑筋肉腫の治療標的である, 第58回日本婦人科腫瘍学会学術講演会, 7.8-10/'16, 鳥取
4. Kakuda, M. Matsuzaki, S. Tanaka, Y. Takata, T. Kobayashi, E. Ueda, Y. Yoshino, K. Kimura, T., ATP7A is a

promising therapeutic target for uterine leiomyosarcoma, 第68回日本産科婦人科学学会学術講演会, 4.21-24/'16, 東京

5. Kakuda, M. Matsuzaki, S. Tanaka, Y. Takata, T. Kobayashi, E. Ueda, Y. Kimura, T., ATP7B is a promising therapeutic target for uterine leiomyosarcoma, The 107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 4.16-20/'16, New Orleans, U.S.A.
6. 角田守 松崎慎哉 高田友美 小林栄仁 上田豊 吉野潔 木村正, ATP7B は平滑筋肉腫の治療標的である, 第67回日本産科婦人科学術講演会, 4.9-12/'15, 横浜
7. 松崎慎哉 角田守 松崎聖子 久保田哲 中川慧 清原裕美子 平松宏祐 森本晶子 高田友美 小林栄仁 上田豊 吉野潔 木村正, プラチナ耐性因子である Annexin A4 はプラチナ耐性癌の治療ターゲットとなりうる, 第3回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会, 2.21/'15, 福岡

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)  
なし

取得状況(計0件)  
なし

〔その他〕

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者  
松崎 慎哉 (MATSUZAKI, Shinya)  
大阪大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 00467565

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし